

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/53

G01N 33/531 G01N 33/543

G01N 33/564 G01N 33/566

G01N 33/68 C12Q 1/04

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01105023.3

[43] 公开日 2002 年 8 月 14 日

[11] 公开号 CN 1363840A

[22] 申请日 2001.1.4 [21] 申请号 01105023.3

[71] 申请人 上海数康生物科技有限公司

地址 200233 上海市桂平路 481 号 18 楼 2 楼

[72] 发明人 胡廣熙

[74] 专利代理机构 北京三聚阳光专利事务所

代理人 张杰

权利要求书 3 页 说明书 9 页 附图页数 1 页

[54] 发明名称 蛋白芯片及其制备方法和使用方法

[57] 摘要

本发明涉及一种多指标并行检测蛋白的方法，包括：将结合了多个可与体内指标特异性结合的蛋白 B 的固相载体与含目标蛋白 A 的待测液接触，形成稳定复合物 B - A；进一步与多蛋白混合液中对应标记的 A 的特异结合蛋白 C - labelled 反应，形成稳定 B - A - C - labelled，标记是化学发光法的标记物；产生化学发光反应；信号检测。本发明还提供了一种蛋白芯片的制备方法，及用于多指标并行检测的蛋白芯片、试剂盒。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

知识产权出版社出版

BEST AVAILABLE COPY

权利要求书

1. 一种多指标并行检测蛋白的方法，包括：
 - (1) 将结合了多个可与体内指标特异性结合的蛋白 (B) 的固相载体与含目标蛋白 (A) 的待测液接触，并使其充分反应形成稳定复合物 (B-A)；
 - (2) 复合物 (B-A) 进一步与多蛋白混合液中对应标记的 (A) 的特异结合蛋白 (C-labelled) 反应，形成稳定复合物 (B-A-C-labelled)，标记是化学发光法的标记物；
 - (3) 加上产生化学发光反应的化学组合物，使反应发光；
 - (4) 信号检测。
2. 根据权利要求 1 的方法，其中标记物是过氧化物酶。
3. 根据权利要求 2 的方法，其中多蛋白混合液是 (A) 的特异抗体或受体的在稳定溶液中混合并标记过氧化物酶后的混合液。
4. 根据权利要求 2 或 3 的方法，其中过氧化物酶是辣根过氧化物酶。
5. 根据权利要求 1 的方法，反应生成 B-A-C-labelled 后，先除去反应液，并洗涤蛋白芯片，洗涤液配方包含：NaCl 浓度为 0.7% 至 0.9%，Tris 浓度为 1.0% 至 1.5%，Tween 20 浓度为 0.05% 至 0.2%，pH 值在 6.0 至 9.0 之间。
6. 根据权利要求 5 的方法，洗涤液优选配方：NaCl 0.9%，Tris 1.21%，Tween20 0.1%，PH 为 7.50。
7. 根据权利要求 1 的方法，可先将待测液体稀释，稀释液配方包含：NaCl 浓度为 0.7% 至 0.9%，Tris 浓度为 1.0% 至 1.5%，Tween 20 浓度为 0.05% 至 0.2%，酪氨酸浓度为 0.05% 至 0.2%。
8. 根据权利要求 7 的方法，稀释液优选配方：NaCl 浓度 0.9%，Tris 浓度 1.21%，Tween 20 浓度 0.1%，酪氨酸浓度 0.1%。
9. 根据权利要求 1 的方法，多蛋白溶液的稳定液配方包含：70-80%A 溶液 (V/V)+5-20% 乙二醇 (V/V)+1-9% 蔗糖 (W/V) +0.1-1%

01.06.12

proclin(V/V)+0.05-0.5%EDTA.2Na; A溶液—40-60%0.05M、pH7.2的PBS和40-60%胎牛血清。

10. 一种蛋白芯片，包括固相载体和固定于载体上用于多指标并行检测的蛋白。

11. 根据权利要求10的蛋白芯片，其中蛋白指抗原、抗体、受体、配体。

12. 根据权利要求11的蛋白芯片，其中蛋白指疾病标志性蛋白。

13. 根据权利要求12的蛋白芯片，其中蛋白指能与体内肿瘤标志物特异结合的蛋白。

14. 根据权利要求13的蛋白芯片，其中固相载体指无机片基或有机化合物片基。

15. 根据权利要求14的蛋白芯片，其中固相载体指是醋酸纤维素膜，硝酸纤维素膜，尼龙膜，聚丙烯膜。

16. 根据权利要求15的蛋白芯片，其中固相载体指是硝酸纤维素膜。

17. 根据权利要求14的蛋白芯片，其中固相载体指半导体硅片、玻璃片、微孔硅片、微孔玻璃片。

18. 根据权利要求17的蛋白芯片，其中固相载体是玻璃片。

19. 根据权利要求10的蛋白芯片，其中蛋白质的分布密度每平方厘米至少25点。

20. 根据权利要求10的蛋白芯片，其中蛋白质的量是0.1ng/dot至10ng/dot范围内。

21. 一种蛋白芯片的制备方法：

(a) 在固相载体上以一定的排列次序固定多种蛋白质；

(b) 然后用封闭液将固相载体的非点样部位封闭，冻干保存。

22. 根据权利要求21的制备方法，其中蛋白质是以共价结合或物理吸附的原理固定到固相载体表面的。

23. 根据权利要求21的制备方法，其中封闭液含有NaCl, Tris, Tween

20 和酪氨酸，终浓度：NaCl 浓度为 0.7% 至 0.9%，Tris 浓度为 1.0% 至 1.5%，Tween 20 浓度为 0.05% 至 0.2%，酪氨酸浓度为 0.05% 至 0.2%，其余为水。

24. 根据权利要求 23 的制备方法，封闭液终浓度：NaCl—0.9%，Tris—1.21%，Tween 20—0.2%，酪氨酸—0.1%，BSA—5%，蔗糖—4%，proclin—0.5%。

25. 根据权利要求 21 的制备方法，蛋白质先溶于包被液，包被液：pH 为 9.0—10.0 的 NaHCO_3 — Na_2CO_3 缓冲液。

26. 一种用于多指标并行检测的试剂盒，利用化学发光反应同时检测多种生物大分子在体液内的含量，该试剂盒包括：

- (a) 一种用于多指标并行检测的蛋白芯片；
- (b) 一种以一定浓度配比配制而成，并标记过氧化物酶的的多蛋白质混合液；
- (c) 一种用于稀释被测体液的稀释液；
- (d) 一种由产生并增强化学发光反应的化合物组成的化学组合物；
- (e) 一种蛋白芯片的洗涤液；
- (f) 一种被检蛋白质的标准混合液。

27. 权利要求 26 所述的试剂盒，其中所说的过氧化物酶是辣根过氧化物酶。

28. 权利要求 26 所述的试剂盒，其中所说的标准混合液是每种芯片上蛋白质对应结合的应在体液中被检测到的蛋白质，在稳定液混合并标记过氧化物酶后的混合液。

说 明 书

蛋白芯片及其制备方法和使用方法

本发明涉及蛋白质芯片及其制备方法和使用方法。

生物芯片技术是九十年代中期兴起的一项新兴生物技术，因其可在一次反应中进行多种信息的平行分析，而受到众多研究者的瞩目，迅速在诸多生物学领域得到应用。生物芯片技术按检测对象分类，主要分为基因芯片和蛋白芯片两类。

基因芯片主要用于基因表达分析、基因组比较分析、多态性分析以及疾病的基因诊断等。由于基因芯片在人类基因组计划的研究工作中的重要作用，此技术在短短几年内得到了长足的发展。但基因芯片技术成本高，芯片的制备比较复杂，样品的准备与标记较为繁琐，且其信号检测的灵敏度也有待于进一步提高，这些问题使得目前对该技术的应用大多停留在实验室研究阶段，离临床检验及疾病诊断的普及性应用还有一段距离。

蛋白芯片是一项更为前沿的技术。它通过固定于支持介质上的多种蛋白质构成的微阵列，直接检测特定功能物质（标志性蛋白）。目前对蛋白芯片的研究和应用尚很少。

现在，人类基因组计划即将完成，生物科学的研究重心即将从基因组研究转向蛋白质组的研究。蛋白芯片以其特有的优势，可为现代医学诊断学提供高效、便捷、准确的临床检测手段，对疑难病症的确诊及恶性疾病（如肿瘤）的早期诊断和及时治疗有重大的意义。此技术的成熟和应用必将在新世纪的疾病诊断和治疗，新型药物开发，探索疾病的分子机理等生命科学相关领域有巨大的应用前景。

现有的检测尿液、血清及其它体液的方法很多，检测方式大致包括ELISA、放射性同位素标记、金标、荧光、化学发光、时间分辨荧光等形式，检测的材料有酶标板、试剂条、试管、硅化玻璃等多种，多应用于检测体液

中疾病性标志蛋白、激素、流行病毒、细胞因子等指标。这些方法均是在抗原抗体反应的基础上，采用酶、同位素、胶体金、荧光基团、镧系元素等不同标记形式，进行定量或定性检测。然而，现有的检测方法大多是单指标检测，信息量小，而且均有其局限性（如标记步骤复杂、试剂和仪器昂贵、操作烦琐、灵敏度低、易污染等）。

本发明的目的是提供一种蛋白芯片的制备方法。

本发明的另一目的是提供一种用于多指标并行检测的蛋白芯片。

本发明还提供了一种多指标并行检测蛋白的方法，其中包括了对上述蛋白芯片的使用方法。

本发明还提供了用于多指标并行检测的试剂盒。

本发明所述用于多指标并行检测的蛋白芯片的制作方法如下：

(a) 使用芯片自动点样系统，通过物理吸附或共价结合的方式，将多种蛋白质以一定的排列次序固定在固相载体上；(b)然后用封闭液将固相载体的非点样部位封闭，冻干保存。固相载体是无机片基或有机化合物片基，无机片基包括半导体硅片、玻璃片、微孔硅片、微孔玻璃片等，优选玻璃片；有机片基包括醋酸纤维素膜、硝酸纤维素膜，尼龙膜，聚丙烯膜等，优选硝酸纤维素膜。蛋白质可以是抗原、抗体、受体、配体等，进一步指能与体内疾病性标志蛋白特异结合的蛋白，尤其是肿瘤标志性蛋白。

本发明中的受体指：受体是细胞膜上或细胞内能识别生物活性分子(药物、毒素、神经递质和激素、抗原和细胞粘附分子等)并与之相结合的生物大分子。它们能将生物活性分子产生的信息传递到效应器，从而引起相应的生物效应。这些生物大分子多数是蛋白质，个别的糖脂。配体是能与受体特异结合的生物活性分子(即药物、毒素、神经递质和激素、抗原和细胞粘附分子等)。抗原和抗体由于其免疫上的特殊功能，可单独归为一类。本发明中指的受体和配体是蛋白质。

蛋白芯片具体制备步骤：

以下浓度单位除非特指均为 W/V。

包被液: pH 为 9.0-10.0(最佳 9.6) 的 CBS (NaHCO₃-Na₂CO₃)。

包被液的作用是提供一定的 PH 范围, 使得蛋白质和固相载体之间的化学反应或物理吸附反应在液相能更好地结合。

封闭液: 含 0.1-0.5%Tween20, 0.02-0.3%酪氨酸, 1-9%BSA, 1-9% 蔗糖, 0.1-1%proclin 的 TBS(最佳为含 0.2%Tween20, 0.1%酪氨酸, 5%BSA, 4%蔗糖, 0.5%proclin 的 TBS)。其优点是: 酪氨酸和 BSA 都有封闭作用, proclin 可防腐, 蔗糖是惰性物质, 能隔绝空气, BSA 和蔗糖可作为支持框架结构的物质。封闭液的作用使固相载体的其他部位不能结合蛋白质, 从而保证实验数据的准确性。

本发明还尝试了多种封闭液: TTBS—0.1%(V/V) Tween20 的 TBS, 含 10% 脱脂奶粉的 TBS, 含 0.2%酪蛋白的 TTBS。参照的文献有: Bejerrum and Schater-Nielsen, 1986; Gillespie and Hudspeth, 1991; Harlow and Lane, 1988; Schneppenheim et al., 1991.

5%(W/V) 脱脂奶粉的 PBS。参照的文献为: Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd ed): J. sambrook, E. F. Fritsch T. Maniatis, 本发明提供的封闭液明显优于上述二种。

1) 将蛋白芯片上所要点制的蛋白质以一定浓度溶于包被液中, 然后用芯片自动点样系统将这些蛋白质点制在固相载体上, 点样密度 25-200 点/cm², 点样量 0.1-10ng/点。

2) 放置过夜。

3) 用封闭液将蛋白芯片封闭冻干处理, 储存于 4 度。

为了使我们的芯片上所点的多种蛋白质在发生一系列反应后产生的化学发光信号能在相邻两个数量级上(最强点/最弱点<100), 以便于同一检测仪器的检测, 我们事先调节了芯片上蛋白质的浓度。

一种多指标并行检测蛋白的方法, 包括:

(1) 将结合了多个可与体内指标特异性结合的蛋白 B 的固相载体与含目

标蛋白 A 的待测液接触，并使其充分反应形成稳定复合物 B-A；

- (2) 复合物 B-A 进一步与多蛋白混合液中标记的 A 的特异结合蛋白 C-labelled 反应，形成稳定 B-A-C-labelled，标记是化学发光法的标记物；
- (3) 加上产生化学发光反应的化学组合物，使反应发光；
- (4) 信号检测。

其中，蛋白探针 B 可以是抗原、抗体，及可与 A 结合的受体，进一步指能与体内疾病标志性蛋白特异结合的蛋白。固相载体是无机片基或有机化合物片基，无机片基包括半导体硅片、玻璃片、微孔硅片、微孔玻璃片等，优选玻璃片；有机片基包括醋酸纤维素膜、硝酸纤维素膜，尼龙膜，聚丙烯膜等，优选硝酸纤维素膜，可以在蛋白芯片形式存在。标记物可以是过氧化物酶，进一步过氧化物酶是辣根过氧化物酶，多蛋白混合液是 A 的特异抗体或受体的在稳定溶液中混合并标记过氧化物酶后的混合液，每种蛋白 B 对应的 C-labelled 的混合液，不同指标蛋白 B 可以有相同的 C-labelled。

其中洗涤液配方为：NaCl 浓度为 0.7% 至 0.9%，Tris 浓度为 1.0% 至 1.5%，Tween 20 浓度为 0.05% 至 0.2%，pH 值在 6.0 至 9.0 之间。优选配方为 NaCl-0.9%，Tris-1.21%，Tween20-0.1%，PH 为 7.50。

其中所说的稀释液配方为：NaCl 浓度为 0.7% 至 0.9%，Tris 浓度为 1.0% 至 1.5%，Tween 20 浓度为 0.05% 至 0.2%，酪氨酸浓度为 0.05% 至 0.2%。优选配方：NaCl 浓度 0.9%，Tris 浓度 1.21%，Tween 20 浓度 0.1%，酪氨酸浓度 0.1%。

被检物标准品指每种芯片上蛋白质对应结合的被检测蛋白质(应在体液中被检测到)以一定浓度混合配制成，此标准品与蛋白芯片的结合，经过一系列反应，产生的光信号在一个可比的范围内。

被检物标准品和多蛋白质混合液的稳定溶液配方均为：

70-80%A 溶液 (V/V)+5-20% 乙二醇 (V/V)+1-9% 蔗糖 (W/V) +0.1-1% proclin (V/V)+0.05-0.5%EDTA.2Na(A 溶液—40-60%0.05M 的 PBS(pH7.2) 和 40-60%胎牛血清).最佳配方：80%A 溶液 (V/V)+19%乙二醇 (V/V)+3%蔗糖 (W/V)

+0.5% proclin (V/V)+0.2%EDTA. 2Na, (A 溶液—60%0.05M 的 PBS (pH7.2) 和 40% 胎牛血清).

***配制被检物标准品的溶液与多蛋白质混合液的稳定溶液配方相同，其用途均是使不同蛋白质混合后仍不会丧失活性。

产生化学发光反应的组合物：化学发光反应为 2 种：普通化学发光反应 (Chemiluminescence) 和 增 强 的 化 学 发 光 反 应 (Enhanced Chemiluminescence)。本发明用的是增强的化学发光反应。反应涉及的试剂是：Luminol (5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione Sodium Salt), H₂O₂ (过氧化氢)，增强子 Enhancer (Eosin-曙红或 PIP-对碘苯酚)，过氧化物酶 (如辣根过氧化物酶 HRP)，均购自 Sigma 公司。

反应式是：Luminol+H₂O₂+过氧化物酶+Enhancer+NaOH → 3-APA+Light (反应的摩尔比均为 1)。

本发明所述用于多指标并行检测的蛋白芯片的使用方法如下：

1) 用稀释液将待检测的体液上清液稀释，一般稀释 5-20 倍，使最后产生的光信号强度适于检测。

2) 吸取稀释后的样品，按照每平方厘米蛋白芯片约 500ul 的体积滴加到蛋白芯片表面，在 200-300rpm 和 20-37 度下振摇 20-30 分钟，使体液中的特定蛋白质 (A) 与固定于蛋白芯片上的其特异性结合蛋白 (B) 起反应，形成稳定复合物 B-A；

3) 吸干反应液，将蛋白芯片放在洗涤液中振摇洗涤 3-6 分钟，重复三次。

4) 吸取已标记过氧化物酶的多蛋白质混合液，按照每平方厘米蛋白芯片约 500ul 的体积滴加到蛋白芯片表面，在 200-300rpm 和 20-37 度下振摇 20-30 分钟，使稳定复合物 B-A 中的 A 部分与多蛋白质混合液中对应标记过氧化物酶的特异性结合蛋白 (C-labelled) 起反应，形成稳定的三聚物 B-A-C-labelled。

5) 吸干反应液，将蛋白芯片放在洗涤液中振摇洗涤 3-6 分钟，重复三

次。

6) 在晾干后的芯片表面滴加产生化学发光反应的化学组合物($100\mu\text{l}/\text{cm}^2$)，20-37度催化反应3-5分钟。

7) 取出芯片，15分钟内用特定的化学发光检测仪探测光信号。

如采用标准品作对照，则被检样品对标准品有强烈信号差异，表明该指标呈阳性。

本发明所述用于多指标并行检测的蛋白芯片其一个显著优点是引入多种疾病指标，使得检测的准确性大大增加。现有的疾病指标绝大多数是非特异性指标，不仅多个标志物含量在同一疾病同时显著升高，而且同一标志物含量在多种疾病皆会升高，这种情况导致疾病诊断上会出现误诊。就拿肿瘤的检测来说，现有的疾病标志性蛋白均是非特异性指标，就连公认的原发性肝癌指标 AFP(甲胎蛋白)对肝癌的检出率只有70%左右，并且 AFP 在某些睾丸癌、畸胎瘤、胃癌、胰腺癌等患者血清中也有明显增高。因此提出了多种标志物联合检测的必要性。如胰腺癌：CA19-9 检出率约 60%，加上 CA125、CA50 及 DU-PAN-则可把检出率提到 90% 以上。再如肺癌：单用 CEA 对肺癌诊断已有较高的特异性，但如加上 NSE、唾液酸、CEA、SCC 则特异性更高。

本发明所述用于多指标并行检测的蛋白芯片的另一个优点是灵敏度高，利用化学发光反应和增强发光反应使得本蛋白芯片可检测每毫升体液中含量仅有 1pg 的目标蛋白。这使得一些特异性高但在体液中含量很低的蛋白指标可以被用于临床检测，从而扩大了临床检测指标的选择范围。

医用体外诊断试剂的技术指标，本发明蛋白芯片的达标情况：

灵敏度：真阳性/(真阳性+假阴性) > 80%；

检测下限对血清样品为 10^{-12} 克/毫升。

特异性：真阴性/(真阴性+假阳性) > 95%。

稳定性：4℃可稳定放置 2 年；37℃可稳定放置 1 周。

简便性：1.5 小时内完成实验。

安全性：无放射性，无污染。

本发明还提供了一种用于多指标并行检测的试剂盒，利用化学发光反应同时检测多种蛋白质在体液内的含量。该试剂盒包括：

- (a) 一种用于多指标并行检测的蛋白芯片；
- (b) 一种以一定浓度配比配制而成，并标记过氧化物酶的多蛋白质混合液；
- (c) 一种用于稀释被测体液的稀释液；
- (d) 一种由产生并增强化学发光反应的化合物组成的化学组合物；
- (e) 一种蛋白芯片的洗涤液；
- (f) 一种被检蛋白质的标准混合液(标准品)。

多蛋白混合液、稀释液、发光化学组合物、洗涤液、标准混合液标记物均按照多指标并行检测蛋白的方法选择、配制。

下面结合附图和具体实施例进一步阐述本发明，但并不限制本发明的范围。

图1是标准血样(左)和肝癌患者血样(右)用本发明蛋白芯片检测的结果。

实施例1 蛋白芯片的制备

固相载体：硝酸纤维素膜。固相载体上所用蛋白质：检测肿瘤标志性蛋白的单克隆抗体，所用量为5ng，点样密度为25点/0.36cm²。

点样物为A1, A2—CA153抗体，A3, A4—CA19-9抗体，B1, B2—CA125抗体，B3, C4—AFP抗体，C1, C2—CA125抗体，C3, B4—betaHCG抗体，B5, C5—CA19-5抗体，D1, D2—PSA抗体，D3, E4—CEA抗体，E1, E2—PSA抗体，E3, D4—CA15-3抗体，D5, E5—CA549抗体，A5—负对照。抗体购自Fitzgerald, CanAg。

AFP—甲胎蛋白，CEA—癌胚抗原，PSA—前列腺特异性抗原，betaHCG—人绒毛膜促性腺激素beta亚基，CA—统称糖类抗原。

包被液：PH9.6的CBS(NaHCO₃-Na₂CO₃)。

封闭液终浓度：NaCl 0.9%，Tris 1.21%，Tween 20 0.2%，酪氨酸

0.1%, BSA 5%, 蔗糖 4%, proclin 0.5%。

1) 将蛋白芯片上所要点制的蛋白质溶于包被液中浓度 0.25, 然后用芯片自动点样系统 (BioGrid Total Array System, BioRobotics 公司) 将这些蛋白质点制在固相载体上。

2) 放置过夜。

3) 用封闭液将蛋白芯片封闭冻干处理, 储存于 4 度。

实施例 2 蛋白的检测

正常人血样和病人血样均来自上海市第八人民医院肿瘤科。

样品稀释液: 同封闭液。

1) 用稀释液将待检测的体液上清液稀释 5 倍。

2) 吸取稀释后的样品, 按照每平方厘米蛋白芯片 $500\mu\text{l}$ 的体积滴加到蛋白芯片表面, 在 300 转/分钟的频率和 37 摄氏度下振摇 25 分钟, 使体液中的肿瘤标志性蛋白与固定于蛋白芯片上的单抗起反应, 形成抗原-抗体复合物;

3) 吸干反应液, 将蛋白芯片放在洗涤液中振摇洗涤 4 分钟, 重复三次。

4) 吸取已标记辣根过氧化物酶的多种单抗混合液, 这些单抗是和上述指标对应的另一种抗体的混合物 (均购自 Fitzgerald, CanAg)。按照每平方厘米蛋白芯片约 $500\mu\text{l}$ 的体积滴加到蛋白芯片表面, 在 300 转/分钟的频率和 37 摄氏度下振摇 25 分钟, 抗原抗体复合物与多种单抗混合液中的另一单抗结合, 形成稳定的三聚物抗体-抗原-另一单抗 (标 HRP) 复合物。

5) 吸干反应液, 将蛋白芯片放在洗涤液中振摇洗涤 4 分钟, 重复三次。

在晾干后的芯片表面滴加产生化学发光反应的化学组合物 ($100\mu\text{l}/\text{cm}^2$), 37 摄氏度催化反应 5 分钟。化学组合物: Luminol (5-amino-2, 3-dihydro-1, 4-phthalazinedione Sodium Salt), H_2O_2 (过氧化氢), 增强子 Enhancer (Eosin-曙红或 PIP-对碘苯酚), 过氧化物酶 (如辣根过氧化物酶 HRP), 均购自 Sigma 公司。

6) 取出芯片, 10 分钟时检测光信号。使光信号通过透镜成像, 再将光

信号转变为数字信号，用软件进行定量分析，可检测到的信号换算成蛋白量是 10^{-12} 克。

结果如图 1，肝癌患者的血样在 (A3, A4) 和 (B3, C4) 处与正常血样相比有强烈的信号，为两个肝癌标志物 CA19-9 和 AFP。

说 明 书 附 图

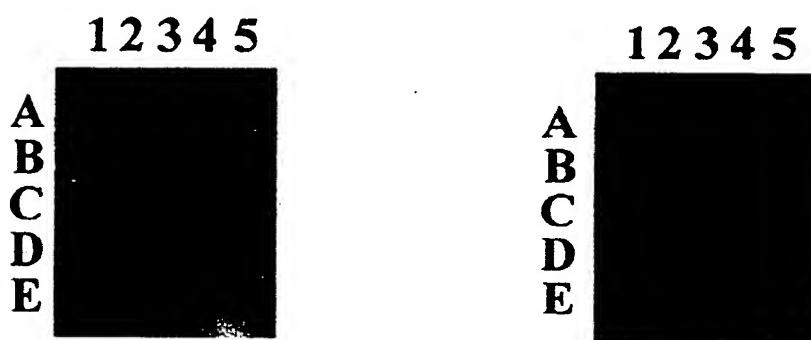


图 1